Über die Wirkungen von Östrogenen, Gestagenen und Kortikosteroiden auf benignes und malignes Gewebe mit einer neuen Diffusionskammertechnik

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Tilo Rothe

Saarbrücken

1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Universitäts-Frauenklinik der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. H. Limburg

Über die Wirkungen von Östrogenen, Gestagenen und Kortikosteroiden auf benignes und malignes Gewebe mit einer neuen Diffusionskammertechnik.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

TILO ROTHE

geb. am 7.3.41 in Aschaffenburg

Dekan: Professor Dr. med. Dhom

Referent: Priv. Doz. Dr. med. U. Heckmann

Promotionsdatum: 4.2.197o

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

UNIV. LEIDEN BIBL.

Einleitung: Seite 1 - 4

Möglichkeiten zur Beurteilung von Hormonwirkungen - Testung der Hormonwirkungen in vitro oder in vivo - Resistenzentwicklung gegenüber Steroiden - zugeführte Hormone, inkretorische und metabolische Regulation - Frage der Proliferationsänderung unter Steroideinfluß - Bedeutung der experimentellen Teste.

Material und Methode: Seite 5 - 14

Auswahl der Gewebe zur Prüfung von Steroidwirkungen - Gewebeaufbereitung - Diffusionskammertechnik im in-vivo-Versuch - Auswahl der Steroidhormone - Färbemethode der gewonnenen Präparate - Kriterien der Auswertung.

Ergebnisse: Seite 15 - 29

Östrogen-, Gestagen- und Kortikosteroidwirkungen an den getesteten Gewebearten - Veränderungen am Versuchstier.

Diskussion: Seite 30 - 37

Beeinflussung der Versuche durch Abwehrreaktionen - Änderungen der Zelleigenschaften unter Hormonwirkung als Grundlage für veränderte Wachstumstendenz - Diskussion der Ergebnisse unter klinisch- therapeutischem Aspekt.

Zusammenfassung: Seite 38, 39

Anhang: Literaturnachweis, Danksagung, Lebenslauf.

Einleitung:
Die Wirksamkeit einer cytostatischen Therapie mit Hormonen ist bisher fast ausschließlich klinisch oder histologisch zu beurteilen gewesen. Eine objektive Beurteilung der Wirkung an der Tumorzelle ist nur in begrenztem Ausmaß möglich.

Ein Weg, der neue Aussagen über den Wert einer Hormontherapie am Wirkungsort erlaubt, führt über die Testung dieser Medikamente in der Gewebekultur. Die Züchtung menschlichen Gewebes in vitro ist durch Verbesserung der Wachstumsbedingungen zu einem Optimum gelangt und besonders für die Chemotherapie maligner Geschwülste zu einem ausgereiften Testverfahren entwickelt worden (Limburg und Krahe 1964).

Beobachtungen über Wachstumsverhalten und biochemische Veränderungen unter der Behandlung mit Steroidhormonen liegen für verschiedene, zumeist tierische Gewebe in in-vitro-Versuchen bereits vor. Die metabolischen Abbauprodukte dieser Hormone im Organismus bleiben hierbei unberücksichtigt.

Im Gegensatz zur Hormontherapie mit antigonodotroper Wirkung, wie sie bei Trägern von Mammakarzinomen geübt wurde und bei Prostatakarzinom-Patienten heute noch unerläßlich ist, ergeben sich bei der Behandlung von Tumoren des weiblichen Genitale mit gleichgeschlechtlichen Steroidhormonen unter bestimmten Bedingungen ebenfalls mitosehemmende Effekte, die schon 1942 von Lettré beschrieben und gedeutet wurden.

Einige Steroidhormone zeigen in Abhängigkeit von ihrer Wasserlöslichkeit und Konzentration am Wirkungsort Effekte, die sich nur durch ihre antagonistisch wirkenden Abbauprodukte - in Konkurrenz mit anderen Steroiden - erklären lassen.

Diese Erscheinung unterstützt die Schultz-Arndtsche Regel, die sinngemäß besagt, daß die wachstumsanregende Wirkung eines Hormones mit steigender Dosis in ihr Gegenteil umschlägt (39).

Durch neuere Untersuchungen über die Wirkung von Steroidhormonen auf das Wachstum menschlicher Karzinome in der Gewebekultur ließ sich in-vitro ein direkter cytostatischer Effekt an den Tumorzellen nachweisen (24, 26, 27). Die pharmakologische Wirkung des Hormons in-vitro kann nur durch das zu testende Tumorgewebe selbst beeinflußt werden. Bei diesen Versuchen fiel auf, daß sich manche Tumoren gleicher Art, aber von verschiedenen Patienten entnommen, resistent gegen Steroide verhielten. Diese Beobachtung steht in Analogie zu der primären Cytostatica-Resistenz. Jedoch war im Gegensatz zur Cytostatica-Behandlung das Tumorgewebe bei der Testung mit Steroiden nicht zum ersten Mal mit diesen Hormonen in Berührung gekommen. Es muß deshalb angenommen werden, daß sich die Resistenz gegenüber einer cytostatischen Therapie mit Steroiden beim Tumorträger unter einem Hormonspiegel entwickelte, der weitgehend in physiologischen Grenzen lag.

Berliner (4) erklärt die Resistenzentwicklung durch das Auftreten der Biotransformation: In den Tumorzellen werden zunächst durch das Hormon kerngebundene Faktoren zerstört, die in der intakten (Target)-Zelle normalerweise die metabolische Biotransformation der Hormonstruktur verhindern (4). Die Größe der Biotransformation ist umgekehrt proportional der Aktivität der Wachstumshemmung. Ebenso scheinen bei der Resistenzentwicklung gleichzeitig Veränderungen der Permeabilität an der Zelloberfläche eine Rolle zu spielen (4).

Eine neue Diffusionskammertechnik unter Verwendung von Plexiglaskammern und Milliporefilter

wurde mit Erfolg zu in-vivo-Testung von Cytostatica eingesetzt und konnte als ergänzendes Testverfahren die Ergebnisse der in-vitro-Versuche bestätigen (25).

Für die Fragestellung der Hormonwirkung auf menschliches benignes und malignes Gewebe wird die Diffusionskammertechnik im Tierversuch in Analogie zum Chemotherapie-Test mit Cytostatica herangezogen.

Bei dieser Versuchsanordnung entfallen immunologische Abwehrreaktionen des Versuchstieres auf das Untersuchungsgut. Das im Tierkörper weiterlebende Gewebe kann auf Proliferationsaktivität und morphologische Veränderungen untersucht werden (28).

Der Wirkungsgradient der dem Versuchstier applizierten Hormondosis ist im Gegensatz zum in-vitro-Versuch nicht konstant. Er wird beeinflußt durch das tiereigene inkretorische System, ebenso durch die Leber als metabolisches Zentrum, als auch durch die Funktion des enterohepatischen Kreislaufes, der bereits durch die Galle ausgeschiedene noch wirksame Substanzen dem Organismus zurückführen kann. Gleichfalls zu berücksichtigen sind auch die Durchblutungsverhältnisse im tierischen Organismus, die als Transportweg zusammen mit dem Fettbestand die Verteilung der Hormone beeinflussen (65) und im Verein mit den Nieren die Ausscheidung bestimmen.

Der menschliche und tierische Organismus ist in der Lage Hormone über teilweise verschiedene Wege abzubauen. Die Art des jeweils ablaufenden Metabolismus ist sowohl organ- als auch funktionsabhängig. Die Abbaustufen der Hormone und die pharmakologische Wirkung dieser Intermediärprodukte sind zum Teil noch unbekannt.

Alle diese bei der Prüfung einer therapeutischen Hormonwirkung zu berücksichtigenden Einflüsse, begründen die Notwendigkeit des Tierversuches.

Es ist das Ziel dieser Untersuchung, die Wirkung therapeutisch eingesetzter Steroidhormone zu messen. Es werden Hormone, insbesondere konjugierte Östrogene auf ihre Wirkung am Endometrium geprüft und hormonbedingte Wachstumsänderungen am Adenocarcinoma uteri, am Ovarialkarzinom und vergleichsweise an durch DMBA induzierten Rattentumoren untersucht.

An Hand der systematischen Durchtestung soll festgestellt werden, welche Veränderungen menschliches Endometrium erfährt, wenn es mit den zur Behandlung klimakterischer Beschwerden angegebenen Dosen von Presomen R behandelt wird. Auch die Wirkung von Ultracorten-H R und SH 582 wird am Endometrium geprüft.

Die Ansprechbarkeit maligner Geschwülste des weiblichen Genitale auf die gleichen Präparate soll zeigen, inwieweit sich diese Substanzen in die cytostatische Palliativ-Therapie eingliedern lassen und ob eine routinemäßige Resistenzbestimmung in-vivo analog oder zusammen mit dem Chemotherapie-Resistenztest zu fordern ist.

Material und Methode:
Aus 40 verschiedenen Operationspräparaten wurde geeignetes Material entnommen und in 170 in-vivo-Kulturen untersucht. Das vom Menschen stammende Untersuchungsgut umfaßte 22 Endometrien im Zustande der Funktion und Atrophie, sowie 5 Adenokarzinome des Corpus uteri und 6 Adenokarzinome des Ovars (Tab. 1).

Untersuchungsmaterial für die Hormonwirkungen im In-Vivo-Test.

Gewebeart	Zahl der Gewebe	In-Vivo-Teste
Endometrium	22	90
Corpus-Ca.	5	23
Ovarial-Ca.	6	25
DMBA-Tu.	7	32
Insgesamt	40	170

Tab. 1
Anzahl der Gewebe und In-Vivo-Teste der verschiedenen Ausgangsmaterialien.

Als Endometrien im Zustande der Funktion sind solche von Frauen vor der Menopause anzusehen, die sich nach histologischer und zytologischer Untersuchung als funktionsfähig erwiesen. Die atrophischen Endometrien stammten von Patientinnen in der Postmenopause. Zum Vergleich wurden 7 chemisch induzierte Tumoren der Ratte in die Untersuchung miteinbezogen. Es handelte sich hierbei um sarkomatöse Geschwülste, die sich nach subcutaner Injektion einer 1-3%igen Lösung von 7, 12-Dimethylbenzathrazen in Olivenöl bildeten. Die Latenzzeit betrug drei bis vier Monate.

Die Aufbereitung der untersuchten Gewebe erfolgte nach einer in Anlehnung an Dulbecco und Vogt (16) modifizierten Methode von Limburg und Krahe (42). Dieses Vorgehen hatte sich bei der Resistenzprüfung menschlicher Karzinomgewebe gegen Cytostatica im in-vivo-Test bewährt.

Ein oder mehrere Stücke wurden den Operationspräparaten entnommen. Ein Teil dieser Zuschnitte wurde zur histologischen Kontrolluntersuchung verwandt, da nach der Aufbereitung eine Indentifizierung der Gewebeart nicht mehr absolut möglich ist. Die vorbereiteten Stückchen wurden in Phosphatpufferlösung (pH 6, 8-7, 2) aufgefangen. Die Lösung diente zugleich als "Waschlösung" zur Beseitigung von Blutkoageln und Gewebsnekrosen. Leichte Grade einer bakteriellen Verunreinigung konnten unter mehrstündiger Einwirkung von Penicillin und Streptomycin beseitigt werden. Nach der mechanischen Zerkleinerung der Gewebe mit der Schere erfolgte im Erlenmeyer-Kolben eine fermentative Aufspaltung des Zellverbandes mit 0,25%iger Trypsinlösung bei 37° C.

Zur Beschleunigung des enzymatischen Vorgangs wurde ein Magnetrührer eingesetzt. Als Maß für die Anzahl der gelösten Zellen galt der Grad der Trübung im Erlenmeyer-Kolben. Anschließend wurde

der fermentative Prozess durch Einbringen des Gefäßes in Eiswasser gestoppt. Zurückgebliebene Gewebsbröckel ließen sich bei der Filtration der Zellsuspension durch Mull zurückhalten. Durch wiederholtes Aufschwemmen der zellhaltigen Lösung in Phosphatpufferlösung wurde das Trypsin ausgewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in Nährmedien folgender Zusammensetzung inkubiert:

1. TCM 199(Tissue Culture-Medium)	25,0 ml
2. Kälberserum	10,0 ml
3. Hanks-Lösung	55,0 ml
4. Vitamin 10% (MEM Solution)	5,0 ml
5. Glutamin 10%	5,0 ml

Dieses standardisierte Nährmedium war mit $NaHCO_3$ auf einen pH-Wert von 6,8 - 7,2 eingestellt worden.

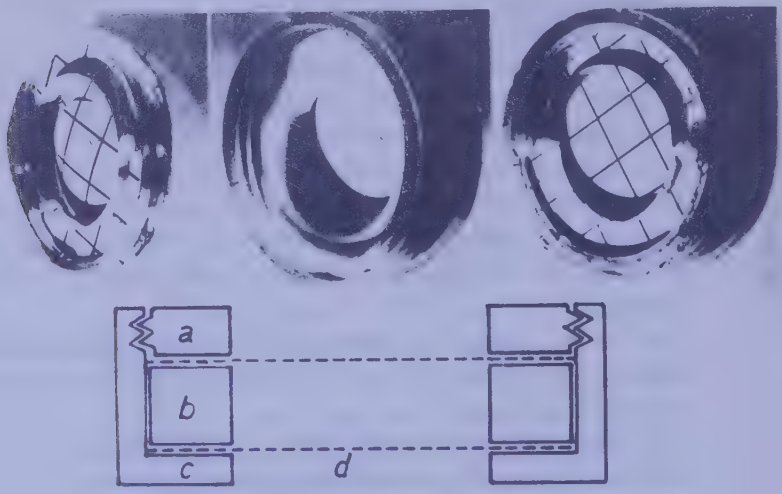
Um sowohl Proliferation als auch cytostatische Effekte beobachten zu können, wurde eine Verdünnung der Zellkonzentration auf 2×10^6 lebende Zellen/ml Nährmedien hergestellt (Nachweis durch Färbung mit 2%iger Trypanblau-Lösung). Die Suspension wurde nach dreimaligen Aufziehen mit einer Record-Spritze für die Füllung der Diffusionskammern bereitgestellt.

Eine Beschreibung der Diffusionskammern soll hier dem weiteren methodischen Arbeitsgang vorangestellt werden:
Die ersten Versuche mit Kammern aus Plexiglas und Membranfiltern waren belastet durch mangelhafte Dichte der mit Spezialzement abgeschlossenen Hohlräume. Außerdem zeichneten sich diese Kunststoffe (ungenügend hoch polymerisierte Acrylate) durch erhebliche Gewebeunverträglichkeit aus (2).

Auf Grund dieser Tatsachen entwickelten Teichmann und Mitarbeiter ineinander verschraubbare Metallringe aus 2VA-Stahl, zwischen die Membranfilter, getrennt durch einen Gummiring, dicht eingeschraubt werden konnten (60).

Mit der Entwicklung genügend hochpolymerisierter Plexiglas-Kunststoffe konnten diese für die Herstellung von Diffusionskammern wieder Verwendung finden. Es zeigte sich in Vorversuchen weder Unverträglichkeit auf die Gewebe in der in-vitro-Kultur noch auf den Organismus der Versuchstiere.

Das Kammergehäuse besteht aus einem flachzylindrischen Hohlkörper aus Plexiglas mit Bodenöffnung und Innengewinde an der oberen Circumferenz. In das Innere des Gehäuses lassen sich zwei Filter einlegen, die durch einen Teflonring getrennt, den Hohlraum zur Aufnahme der Nährmedium-Zellsuspension bilden. Durch einen Deckring aus Plexiglas mit Außengewinde wird das Lumen fest und dicht verschlossen.(Abb.1)



a) Deckring
b) Teflonring
c) Kammergehäuse
d) Millipore-Filter

Abb. 1

Fotografie der zerlegten Diffusionskammer:
links Deckring mit oberem Filter
mitte Kammergehäuse mit unterem Filter und eingelegtem Teflonring
rechts verschraubte implantierfähige Kammer.

Zeichnung eines Durchschnittes einer verschlossenen Diffusionskammer.

Der äußere Durchmesser der Kammer beträgt 17 mm, der innere 15 mm, entsprechend einer Diffusionsfläche an Bodenöffnung und Decköffnung von je 63,6 mm^2. Die Höhe der Kammer ist mit 6 mm, die Höhe des Teflonrings und damit der Abstand der beiden Filter mit 3 mm anzugeben.

Die in unseren Versuchen verwendeten Millipore-Filter haben einen Durchmesser von 15 mm. Ihr Hauptbestandteil ist Zellulosenitrat und Zelluloseester. Die Verwendung dieses Filtertypes mit einer mittleren Porengröße von 0,45 ($\pm$ 0,02) gewährleistet einen freien Austausch von gelösten Nährstoffen, Elektrolyten und auch das Eindringen von Pharmaka (Abb. 2).

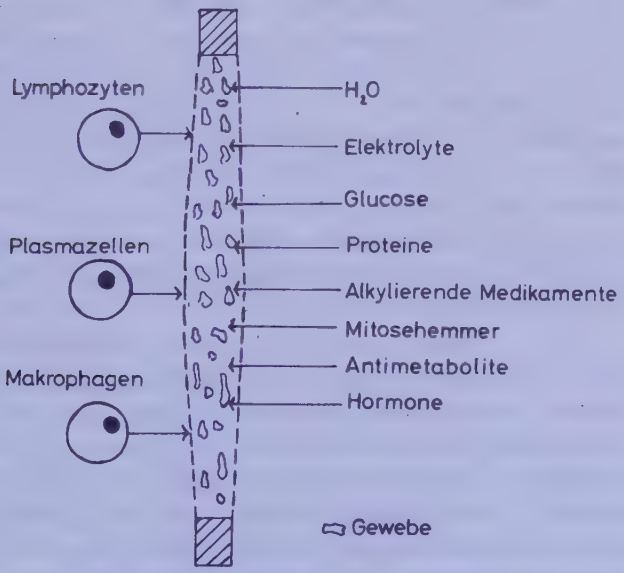


Abb. 2 (nach Heckmann)
Eigenschaften der Milliporefilter, die für die In-Vivo-Teste mit Diffusionskammern unerläßlich sind.

(Die Durchflußrate für H_2O ml/cm^2/min. beträgt bei 25° C und 70 cm Hg Druck: 65 ml/cm^2/min.) Die Filter wurden sterilisiert bezogen.

Die in Kunststoffbeutel eingeschweißten Teile der Kammer wurden im Sterivit (DMB Apparatebau Mainz) mit einem Äthylenoxyd: CO_2-Gemisch (15:85) bei 37° C sterilisiert:

Dem Kunststoffbeutel wurde zunächst das Kammergehäuse entnommen, ein Filterblättchen eingelegt, dann der Teflonring auf den Filter in das Gehäuse eingepaßt Aus der bereitliegenden Record-Spritze wurden nach kurzem Aufschütteln der Nährmedium-Zellsuspension etwa 6-7 Tropfen in das Kammerlumen eingebracht. Diese Menge entspricht dem Inhalt von 190,8 mm^3. Auf die freie Oberfläche des Teflonringes wurde nun das zweite Filterblättchen gelegt und durch Einschrauben des Deckringes die Kammer fest verschlossen. (Die mit einem Anzugsdrehmoment von 0,05 mkg verschraubte Kammer gewährleistet bei einem Klemmdruck auf die Filterränder - unter Berücksichtigung von Ganghöhe und Anstiegswinkel des Gewindes - von 0,4 Kg/cm^2 unter Versuchsbedingungen ausreichenden Dichte). Das Gewicht der gefüllten Kammer betrug 1,395 g.

Die Kammer muß sofort, bis zur Implantation in das Versuchstier, in eine Phosphatpuffer-Kochsalzlösung verbracht werden.

Als Versuchstiere dienten ausschließlich weibliche Ratten eines erbreinen Inzuchtstammes Bd II (Berlin Druckrey) mit einem mittleren Gewicht von 280 g. Den Tieren wurde in Äthernarkose durch einen etwa zwei Zentimeter langen Unterbauchschnitt die Peritonealhöhle eröffnet. Nach Implantation von je zwei Diffusionskammern in das Abdomen des Versuchstieres wurde die Wunde durch Muskel- und Hautnaht versorgt.

Am dritten Tage nach der Operation ist eine einmalige gewichtsabhängige Hormondosis intraperitoneal appliziert worden (Stoßtherapie).

Jedes fünfte Versuchstier blieb unbehandelt. Die in diesen Tieren inplantierten Gewebe dienten als Kontrolle.

Oral wirksame Östrogene konnten durch die Schlundsonde der Ratte eingeflößt werden. Die Wirkungen konjugierter Östrogene auf Endometrium wurden in einer kleinen Versuchsreihe durch Anwendung einer "Dauertherapie" untersucht. Hierbei war eine Dosis protrahiert an fünf aufeinander folgenden Tagen zu je gleichen Teilen verabreicht worden.

Wirkungsunterschiede zwischen intraperitonealer und intravenöser (Schwanzvene) Applikationsform waren in Vorversuchen nicht zu beobachten gewesen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen kamen konjugierte Östrogene, Gestagene und Korticosteroide in nachfolgender Zusammensetzung und Dosierung zur Anwendung:

1.) Presomen (Kali Chemie AG, Hannover):
enthält die Östrogene aus dem Harn schwangerer Stuten, nämlich: Östronsulfat (51%), Equilinsulfat (22%), Equileninsulfat (2,6%), 17 - alpha-Östradiolsulfat (6,4%), 17 - alpha - Dihydroequilinsulfat (16%), 17 - alpha - Dihydroequileninsulfat (1,3%) und andere konjugierte Steroide (0,7%). Die Ketosteroide (Östron, Equilin und Equilenin) liegen als 3 - Mono - Sulfate vor. Die Diole (Östradiol, Dihydroequilin und Dihydroequilenin) finden sich entweder als 3 - Mono - Sulfat, 17 - Mono - Sulfat oder als 3-, 17 - Disulfat.
Entsprechend der klinischen Dosierung von 1,25 mg/70 kg Körpergewicht war die Einzeldosis im in-vivo-Test 0,2 mg/kg Tiergewicht. Lediglich für Untersuchungen am Endometrium wurde diese Dosis protrahiert an fünf aufeinanderfolgenden Tagen zu gleichen Teilen gegeben.

2.) SH 582 (Schering AG, Berlin) ein Depot-Gestagen, das zehnmal wirksamer ist als die natürlichen

Gestagene, besteht aus 19 - nor - 17 alpha - hydroxyprogesteron - 17 n - capronat. Um diese Präparate in wässrige Lösung zu bringen, bedurfte es der Hinzunahme von erwärmten Propylenglycol als Lösungsvermittler. Die benutzte Dosis von 17 mg/kg Tiergewicht entspricht der bei klinischer Anwendung resultierenden Dosis von 1000 mg/60 kg Körpergewicht. Sie liegt demnach doppelt so hoch wie die bei klinischer Therapie empfohlene wöchentliche Dosis von 400 - 600 mgSH 582.

3.) Ultracorten - H (Ciba) = Prednisolon - natrium - tetrahydrophtalat wurde als wasserlösliches Corticosteroid verwandt. Die Dosierung von 1,7 mg/kg Tiergewicht ist der in der klinischen Anwendung geübten Einzeldosis von 100 mg/60 kg Körpergewicht adaequat. (Tab. 2)

Hormondosierungen im In-Vivo-Test

Testsubstanz	Applikationsart	Lösungsmittel	Einzeldosis mg/kg	Konzentration mg/ml
konjugierte Östrogene (Presomen)	oral intraperitoneal	Aqua bidest.	0,2	0,05
Gestagen (SH 582)	intraperitoneal	Propylen-glycol + Aqua bidest.	17	4,25
Kortikosteroid (Prednisolon)	intraperitoneal	Aqua bidest.	1,7	0,425

Tab. 2
Therapieschema zur Behandlung kammertragender Ratten.

Am sechsten Tag nach der Implantation der Diffusionskammern wurden die Versuchstiere getötet und die Kammern entnommen. Die Kammerentnahme bei den Versuchen über die Wirkung konjugierter Östrogene auf

Endometrium durch Dauertherapie erfolgte am zehnten Tag.

Jeder Arbeitsschritt, angefangen vom Operationspräparat bis zur Entnahme der Kammern geschah unter sterilen Kautelen.

Bei der Entnahme der Diffusionskammer am 6. bzw. 10. Tag nach der Implantation, ergaben sich bei Inspektion der Bauchhöhle kein Anhalt für pathologisch-anatomische Veränderungen. Bindegewebige Reaktionen von Seiten der Ratte in der Umgebung der Kammer waren nur dann festzustellen, wenn bei intraperitonealer Applikationsform des Hormones mit der Injektionsnadel der Filter einer Kammer beschädigt wurde, sodaß ein Anlaß zu zellulären Abwehrreaktionen gegeben war. Diese Versuche wurden als unbrauchbar nicht ausgewertet.

Das Tiergewicht wurde jeweils am Tage der Hormonapplikation und am Ende des in-vivo-Versuches protokolliert.

Mit der sofort in Äther-Alkohol-Gemisch eingelegten Kammer begann die Fixierung der auf dem Filter ausgewachsenen Zellverbände. Nach mindestens zweistündiger Fixierung wurden die bewachsenen Filter mittels Metallclips auf Objektträger aufgetragen und die fast ausschließlich in Monolayer ausgewachsenen Gewebe durch die Färbemethode nach Papanicolaou in einer Modifikation nach Limburg (41) dargestellt:

1.	80%iger Alkohol	5 Min.
2.	Haematoxilin Harris	2 Min.
3.	In Leitungswasser abspülen.	
4.	Orange G 6	3 Min.
5.	In 80%igem Alkohol abspülen.	
6.	Polychromlsg. EA 31	2 Min.
7.	Zweimal in 80%igem Alkohol abspülen.	
8.	In 95%igem Alkohol abspülen.	
9.	Xylol-Alkohol (4:3)	3 Min.
10.	Zweimal in Xylol	5 Min.

Durch die Xylol-Behandlung wurden die Filter transparent, sodaß die Gewebe einer mikroskopischen Auswertung direkt - nach Anfertigung eines Deckglaspräparates - zugänglich waren.

Die Kriterien für die Beurteilung der Hormonwirkungen auf die über den Millipore-Filtern ausgewachsenen Geweben im mikroskopischen Bild waren folgende:

1. Eine semiquantitative Abschätzung des Zellwachstums und der flächenhaften Ausbreitung des Zellrasens nach graduellen Unterschieden. Dabei wurden die expansiven Proliferationen der Drüsen- bzw. der Malignomzellen und der Fibroblasten getrennt berücksichtigt.
2. Quantitative Auszählung der Epitheloid- bzw. der Malignomzellen, ebenso der Fibroblasten pro Flächeneinheit. Die Auswertung wurde unter zu Hilfenahme eines geeichten Okkulargitters (Carl Zeiss) geführt.
3. Mikroskopische Messungen der Kerndurchmesser der Epitheloid- bzw. Malignomzellen mit einer Okkularmesstrecke (Carl Zeiss).

Zur Beurteilung von Epitheloidzellen und Fibroblasten mußten auf dem bewachsenen Filter Stellen ausgesucht werden, die eine Unterscheidung zuließen, ohne jedoch vom Gesamtwachstumsbild abzuweichen.

Nicht messbare Beobachtungen unter der mikroskopischen Auswertung wurden im Einzelfalle protokolliert.

Nach Abschluß der mikroskopischen Beurteilung wurde das Verhältnis der gefundenen Testwerte zum Kontrollwert dargestellt. Für die Kontrolle wurde jeweils der Wert 1,00 und 100% zu Grunde gelegt. Wachstumshemmungen und Zellproliferation sind als Werte unter 1,00 oder 100% und Werte über 1,00 oder 100% abzulesen. Das gleiche gilt für Veränderungen der Kerndurchmesser. Dieses Verfahren läßt eine Zusammenfassung der Einzelergebnisse als Übersicht mit gemittelten Testergebnissen zu.

Ergebnisse:

Wirkungen konjugierter Östrogene auf menschliches Endometrium im in-vivo-Test:
Eine Übersicht über die Hormonwirkungen gibt Tabelle 3, in der die Effekte sowohl auf Endometrium in Funktion als auch auf Endometrium in Atrophie für verschiedene Applikationsformen im Verhältnis zur Kontrolle aufgezeichnet wurden.

Wirkungen konjugierter Östrogene auf menschliches Endometrium im In-Vivo-Test.

	Einzeldosis		1/5 der Einzeldosis pro Tag für die Dauer von 5 Tagen	
	Funktion	Atrophie	Funktion	Atrophie
Drüsenepithelzellen:				
Proliferation	1,05 / 1,13	1,00 / 0,97	2,19 / 1,50	0,87 / 1,15
Kerndurchmesser	1,21 / 1,24	1,15 / 1,15	1,00 / 1,06	1,10 / 1,08
Zellzahl /cm²	1,19 / 1,36	1,21 / 1,18	0,77 / 0,83	1,38 / 1,58
Fibroblastenproliferation	1,17 / 1,11	0,83 / 0,91	1,12 / 1,11	0,85 / 0,90
Zellwachstum insgesamt	1,24 / 1,33	0,81 / 0,93	2,28 / 1,61	0,77 / 1,08

Applikation: oral / parenteral

Tab. 3
Wirkungen konjugierter Östrogene auf menschliches Endometrium im Vergleich zur Kontrolle (Kontrollwert = 1,00).

Signifikante Unterschiede zwischen oraler und parenteraler Behandlung ließen sich nicht nachweisen. Bei einmaliger Östrogengabe zeigte sich am atrophischen Endometrium keine Erhöhung des expansiven Wachstums, obgleich die Zellzahl pro Flächeneinheit bei kaum vergrößerten Kerndurchmessern etwas anstieg. Noch deutlicher wurde dieses Verhalten, wenn die gleiche Östrogenmenge protrahiert über fünf Tage zu je gleichen Teilen gegeben wurde. Einen Zuwachs der Gesamtwachstumsrate um 128% nach oraler Gabe bzw. 61% nach parenteraler Applikation von Östrogenen ergab sich dagegen unter der protrahierten Behandlung am Endometrium in Funktion. Einen sehr hohen Anteil am Gesamtwachstum hatte der Proliferationsgrad der Drüsenepithelzellen. Der Effekt einer einmaligen Östrogendosis am Endometrium in Funktion war zwar evident, jedoch zugunsten einer Stromaproliferation verschoben. Das Kern-Plasma-Verhältnis der Epithelzellen verhält sich unter diesen Bedingungen umgekehrt zu dem bei protrahierter Hormongabe; denn unter der Behandlung mit mehreren kleinen Östrogenmengen erfuhren die Kerndurchmesser der Drüsenzellen gegenüber denen der Kontrollen keine Veränderungen. Das Fibroblastenwachstum am atrophischen Endometrium war gehemmt.

Die für Endometrium-Kulturen typische Verteilung von Drüsen- und Stromazellen, wie sie an unbehandelten Geweben beobachtet werden konnte - Epithelnester werden von leicht verdichteten Fibroblastenzügen umgrenzt - lassen sich unter Verabreichung von Östrogenen nicht in dieser Deutlichkeit erkennen, am wenigsten noch bei atrophischen Endometrium. (Abb. 3, 4).

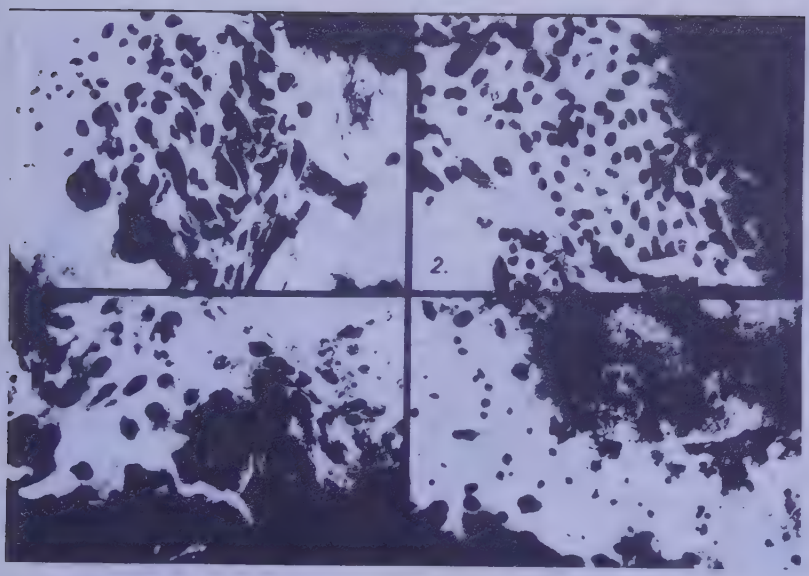


Abb. 3
Steroidwirkungen auf menschliches Endometrium in Funktion im In-Vivo-Test.

1.) Kontrolle, (unbehandelt)
Drüsenepithelzellen und Fibroblasten
normales Verteilungsmuster

2.) Östrogen,
gesteigerte Proliferation der Epithelzellen

3.) Gestagen,
Zellzahl unbeeinflußbar
Auflockerung der Kernstruktur

4.) Kortikosteroid,
cytostatischer Effekt,
Reduktion der Epithelzellen und Fibroblasten

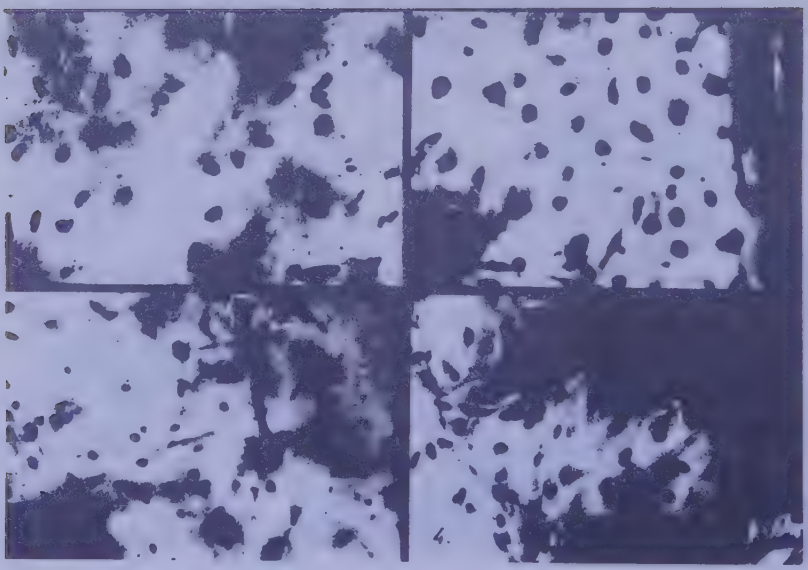


Abb. 4
Steroidwirkungen auf menschliches Endometrium in Funktion im In-Vivo-Test bei fraktionierter Dosis.

1.) Kontrolle,
große Epithelzellen

2.) Östrogen,
gesteigerte Proliferation, Kernverdichtung

3.) Gestagen,
geschrumpfte Zellkerne
Zahl der Epithelzellen
unbeeinflußt

4.) Kortikosteroid,
Zunahme des bindegewebigen Stroma,
Abnahmedder Drüsenepithelzellen

Wirkungen von Gestagen und Kortikosteroid auf menschliches Endometrium in in-vivo-Test (Tab. 4) (Abb. 3, 4):

Wirkungen von Gestagen und Kortikosteroid auf menschliches Endometrium im In-Vivo-Test.

	Gestagen		Kortikosteroid	
	Funktion	Atrophie	Funktion	Atrophie
Drüsenepithelzellen:				
Proliferation	0,85	0,98	0,85	1,63
Kerndurchmesser	1,02	1,09	1,09	1,38
Zellzahl /cm²	1,26	1,18	1,13	0,82
Fibroblastenproliferation	1,04	1,09	1,06	1,03
Zellwachstum insgesamt	1,09	1,09	0,94	1,58

Tab. 4
Gestagen- und Kortikosteroidwirkungen auf menschliches Endometrium verglichen mit der Kontrolle. (Kontrollwert = 1,00)

Die Anwendung von Gestagenen und Kortikosteroiden bestand nur in einer einmaligen Injektion am dritten Versuchstag. Beide Hormone wurden in entsprechender Dosis ausschließlich intraperitoneal appliziert.

Unter der Gestagenbehandlung blieb die Gesamtwachstumstendenz, unabhängig vom Funktionszustand der Endometrien, nahezu unverändert gegenüber den unbehandelten Geweben. Das Gleiche traf zu für die

Fibroblastenproliferation. Das expansive Auswachsen der Drüsenzellen des funktionstüchtigen Endometriums sank unter dem Hormoneinfluß auf 85% der Norm, während die Werte für die Epithelzellen des Endometriums in Atrophie kaum von denen der Kontrollen abwichen. Die Zunahme der Zellzahl pro Flächeneinheit, bei nur gering erhöhten Kerngrößen, weist auf eine geringere Zytoplasmamenge der Drüsenzellen hin. Diese Beobachtungen galten sowohl für diefunktionstüchtigen als auch für die atrophischen Gewebe.

Die oben erwähnte typische Zellverteilung unbehandelter Endometrien läßt sich bei den mikroskopischen Bildern der gestagenbehandelten Gewebe deutlich ausmachen. Dabei ist die Kernstruktur der Epithelzellen leicht aufgelockert, die Nucleoli sind oft zu erkennen.

Nach Kortikosteroidbehandlung war das gesamte Expansivwachstum für Endometrien in Funktion leicht gemindert, deutlicher in der Proliferation der Drüsenepithelzellen. Bei kaum veränderten Kerngrößen sah man eine Erhöhung der Zellzahl pro Flächeneinheit. Daneben waren Kern- und Zytoplasmaverklumpungen zu beobachten. Erstaunlicherweise lag bei den atrophischen Endometrien eine Wachstumssteigerung vor, die sich ausschließlich auf die Drüsenepithelien beschränkt. Die Zellen wurden in Relation zu ihren Kernen erheblich größer. Das Fibroblastenwachstum blieb wie beim atrophischen Endometrium auch bei den Geweben in Funktion unverändert (Abb. 2, Abb.3).

Am Endometrium-Karzinom zeigten die Steroidhormone insgesamt einen steigernden Einfluß auf die Proliferation der Malignomzellen (erhöhte Mitoserate). (Abb. 5).

Abb. 5
Steroidwirkungen auf menschliches Adenocarcinoma corporis uteri im In-Vivo-Test.

1.)Kontrolle,
Züge verdichteter Malignomzellen (Organoides Wachstum?)

2.)Östrogen,
vermehrtes Wachstum der Malignomzellen, Fibroblasten zurückgedrängt

3.)Gestagen,
epithelialer Tumoranteil weitgehend durch bindegewebiges Stroma ersetzt

4.)Kortikosteroid,
gesteigerte Proliferation der Malignomzellen, Fibroblasten kaum vorhanden

Wirkung konjugierter Östrogene auf das Adenocarcinoma corporis uteri im in-vivo-Test:
Konjugierte Östrogene erzeugten unter Testbedingungen schon innerhalb drei Tagen eine Verdoppelung der malignen Zellen, sogar eine weitere Erhöhung der Zellzahl pro Flächeneinheit bei parenteralen Applikationsform der Hormone im Vergleich zur Kontrolle. Die zumeist großkernigen Zellen waren durch Zytoplasmaverlust erheblich verkleinert. Die Ausbreitungstendenz der Karzinomzellen auf dem Millipore-Filter zeigte sich erhöht gegenüber der der Kontrolle. Eine besondere Ordnung in der Verteilung von Malignomzellen und Fibroblasten ließ sich nicht feststellen. Es bestanden jedoch deutliche Wirkungsunterschiede zwischen oraler und parenteraler Applikationsform der Hormone (s. Tab. 5).

Wirkungen konjugierter Östrogene im In-Vivo-Test

Gewebe-arten	Anzahl	Drüsenepithel-bzw. Malignomzellen			Fibroblasten	Zellwachstum	Hormon-wirkung
		Proliferation	Kerndurchmesser	Zellzahl/cm²	Proliferation	insgesamt	
Endometrium	10	1,05 / 1,13	1,21 / 1,24	1,19 / 1,36	1,17 / 1,11	1,24 / 1,33	↗
Corpus-Ca.	5	1,36 / 1,39	1,13 / 1,09	2,01 / 2,40	1,22 / 1,17	1,66 / 1,75	↗
Ovarial-Ca.	6	1,08 / 0,98	1,12 / 1,20	1,12 / 1,32	1,31 / 1,25	1,51 / 1,26	↗
DMBA-Tu.	7	0,87 / 0,75	1,23 / 1,06	0,78 / 0,80	1,29 / 1,11	0,98 / 0,89	↘

Applikation: oral / parenteral

Tab. 5
Wirkung konjugierter Östrogene auf Endometrium, Corpuscarcinom, Ovarialcarcinom und DMBA-Tumor im Verhältnis zur Kontrolle (Kontrollwert = 1,00).

Wirkung von Gestagen auf das Adenocarcinoma uteri im in-vivo-Test:

Unter Gestagengabe war am Endometriumkarzinom keine signifikante Steigerung der Zellzahl pro Flächeneinheit festzustellen. Die Werte für die Malignomzellen lagen zwar bis zu 64% höher als bei den Kontrollen, doch ist diese erhöhte Zellzahl auf eine Änderung der Kern-Plasma-Relation zurückzuführen. Trotz Zunahme der Kerngröße trat bei der Einzelzelle eine absolute Abnahme des Zytoplasmas auf. Eine echte cytostatische Wirkung zeigte sich darin, daß die flächenhafte Wachstumstendenz der Malignomzellen gegenüber der Kontrolle nicht vermehrt war. Besonders hervorgehoben werden muß die Tatsache des erheblichen Wachstums und der Verbreitung der Fibroblasten, die den Hauptanteil des hohen Gesamtwachstums dieser gestagenbehandelten Corpus-Carcinom-Kulturen bildeten. (s. Tab. 6).

Wirkungen von Gestagen im In-Vivo-Test

Gewebearten	Anzahl	Drüsenepithel-bzw. Malignomzellen			Fibroblasten Proliferation	Zellwachstum insgesamt	Hormon-wirkungen
		Proliferation	Kerndurchmesser	Zellzahl/cm²			
Endometrium	9	0,85	1,02	1,26	1,04	1,09	→
Corpus-Ca.	4	1,05	1,10	1,64	1,32	1,99	↗
Ovarial-Ca.	3	1,04	1,11	1,28	1,50	1,66	↗
DMBA-Tu.	7	0,98	1,07	0,79	1,14	1,19	↘

Tab. 6

Wirkungen von Gestagenen auf Endometrium, Corpuscarcinom, Ovarialcarcinom und DMBA-Tumor im Verhältnis zur Kontrolle (Kontrollwert = 1,00).

Wirkungen von Kortikosteroiden auf das Adenocarcinoma uteri im in-vivo-Test:
Unter der Behandlung des Endometriumkarzinomes mit Prednisolon zeigte sich eine immense Zunahme vorwiegend kleinzelliger Karzinomanteile mit stark vergrößerten Kernen. Die Ausbreitung der Malignomzellen auf dem Filter war ebenfalls gegenüber dem Wachstum der Kontrollen erheblich gesteigert. Unter der Einwirkung des Hormones nahmen die Karzinomzellen meistens ausgeprägte polygonale Formen an, die als gut abgegrenzte Einheiten im mikroskopischen Bild auffielen. Das Wachstum der Fibroblasten, die als target-cells für Kortikosteroide zu betrachten sind, ließ sich unter dieser Behandlung in der Korpuskarzinom-Kultur nicht stimulieren. Es trat eher eine Proliferationshemmung auf, da im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen der Fibroblastenanteil noch geringer war (s. Tab. 7).

Wirkungen von Kortikosteroid im In-Vivo-Test

Gewebearten	Anzahl	Drüsenepithel-bzw. Malignomzellen			Fibroblasten Proliferation	Zellwachstum insgesamt	Hormonwirkungen
		Proliferation	Kerndurchmesser	Zellzahl/cm²			
Endometrium	10	0,85	1,05	1,13	1,06	0,94	↘
Corpus-Ca	4	1,47	1,25	2,86	0,94	1,25	↗
Ovarial-Ca.	4	1,09	1,05	1,10	1,05	1,15	→
DMBA-Tu.	7	1,05	1,00	1,21	1,08	0,96	→

Tab. 7
Wirkungen von Kortikosteroid auf Endometrium, Corpuscarcinom, Ovarialcarcinom und DMBA-Tumor im Verhältnis zur Kontrolle (Kontrollwert = 1,00).

Wirkung konjugierter Östrogene auf Adenocarcinoma ovarii im in vivo-Test:
Die Ovarialkarzinome verhielten sich unter Einwirkung östrogener Substanzen in Abhängigkeit von der Applikationsform unterschiedlich. Während nach parenteraler Hormonzufuhr die Kerndurchmesser der Malignomzellen und die Zellzahl pro Flächeneinheit ganz erheblich zunahmen, war dieser Effekt bei oraler Hormongabe wesentlich schwächer ausgeprägt. Unabhängig von der Applikationsart blieb das expansive Wachstum gegenüber den Kontrollen unverändert. Eine Vermehrung der bindegewebigen Elemente, insbesondere der Fibroblasten bestimmte das Gesamtbild der Proliferation. (s. Tab. 5).

Organoide Strukturen, im Sinne einer zweidimensionalen Pseudofollikelbildung, wie sie in in vivo-Wachstumsversuchen mit Ovarialkarzinomgewebe gelegentlich zu beobachten waren, konnten in diesen Untersuchungen nur zweimal registriert werden: das eine Mal unter Östrogenbehandlung, das zweite Mal in einer Kontrollkultur.

Wirkung von Gestagen auf Adenocarcinoma ovarii im in-vivo-Test:
Gestagene bewirkten an den Ovarialkarzinomzellen eine mäßige Zunahme der Zellzahl pro Flächeneinheit. Das Expansivwachstum der Karzinomzellen überragte unter Gestageneinwirkung das der Kontrollkulturen nicht. Das Zytoplasma der Zellen war zugunsten einer Vergrößerung der Kerne reduziert. Einen stärkeren Einfluß übte Gestagen auf das Wachstum der Fibroblasten aus. Die Werte lagen 50% über denen der Kontrolle. Die durch alle Kulturen ziehenden Stromaanteile zeigten einen lockeren Verband. (Tab. 6).

Wirkung von Kortikosteroid auf das Adenocarcinoma ovarii im in-vivo-Test:
Die Meßwerte für die Prednisolonwirkungen auf das Ovarialkarzinom wichen im Mittel nur gering von denen der

unbehandelten Kulturen ab. Summarisch resultierte zwar eine geringfügige Wachstumssteigerung der karzinomatösen Zellanteile, in vielen Einzelfällen jedoch auch eine leichte Wachstumshemmung, sodaß die Hormonwirkung insgesamt am Ovarialkarzinom als indifferent angesehen werden muß. Die erwarteten Hemmwirkungen der Kortikosteroiden auf das Fibroblastenwachstum blieb aus. In allen Kulturen ergab sich kein Unterschied im Vergleich zum Fibroblastenwachstum der Kontrollen. (Abb. 5, Tab. 7).

Wirkungen der verwendeten Steroidhormone auf DMBA-Tumoren: Die zum Vergleich mit in die Untersuchung einbezogenen sarkomatösen Rattentumoren erfuhren unter Östrogen- und Gestageneinwirkung eine echte Wachstumshemmung. Diese war gekennzeichnet durch Zunahme der Kern- und Plasmagrößen der Tumorzellen. Außerdem waren zytotoxische Effekte zu beobachten. Die Fibroblasten konnten sich unter der Hormonwirkung in stärkerem Maße ausbreiten. Nahezu unbeeinflußt blieb der DMBA-Tumor unter der Behandlung mit Kortikosteroiden. Lediglich das Zytoplasmavolumen der Tumorzellen war verringert und deshalb die Zellzahl pro Flächeneinheit erhöht. (Abb. 7).

Eine Übersicht über die Hormonwirkungen auf die Malignen Gewebe geben die Tabellen 5, 6, 7. Hierin sind die als Verhältniszahlen ermittelten Testwerte (Kontrolle = 1 bzw. 100 %) der Steroidhormone am Endometrium denen am Endometriumkarzinom, Ovarialkarzinom und Rattentumor zum Vergleich vorangestellt.

Bei der Beurteilung des Gesamtwachstums einer jeden Kultur, gemessen nach morphologischen Kriterien und bei Beachtung der expansiven Wachstumsform, lassen sich für die Steroidwirkungen auf benigne und maligne menschliche Gewebe im in-vivo-Test im Einzelnen unterschiedliche Ergebnisse erkennen: Unabhängig von der Applikationsart erzeugten Östrogene in 45% der Testkulturen eine Wachstumshemmung, 55% der

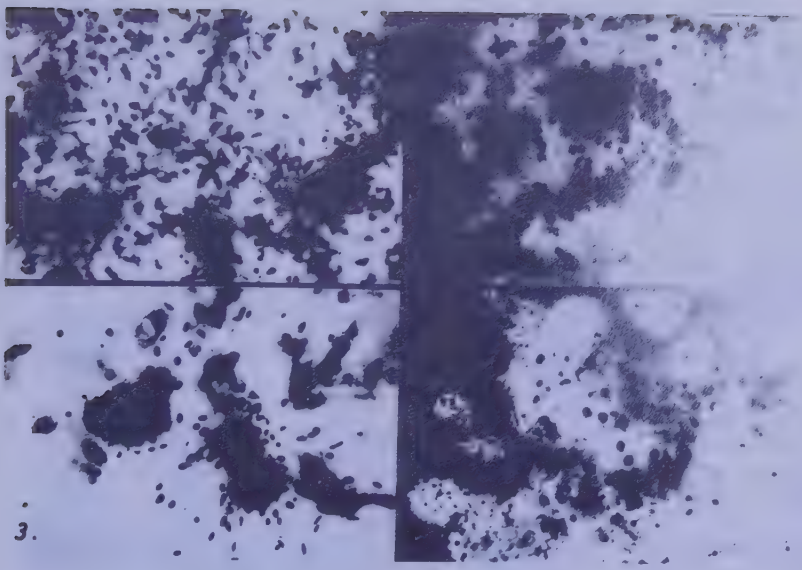


Abb. 6
Steroidwirkungen auf menschliches Ovarialkarzinom im In-Vivo-Test.

1.) Kontrolle,
ungeordnetes Auswachsen der Kultur

2.) Östrogen,
gruppierte Proliferation der Karzinomzellen mit vergrößerten Kernen

3.) Gestagen,
unwesentliche Veränderung der Karzinomzellen

4.) Kortikosteroid,
vergrößerte Kerndurchmesser der Karzinomzellen, Zellzahl gering erhöht

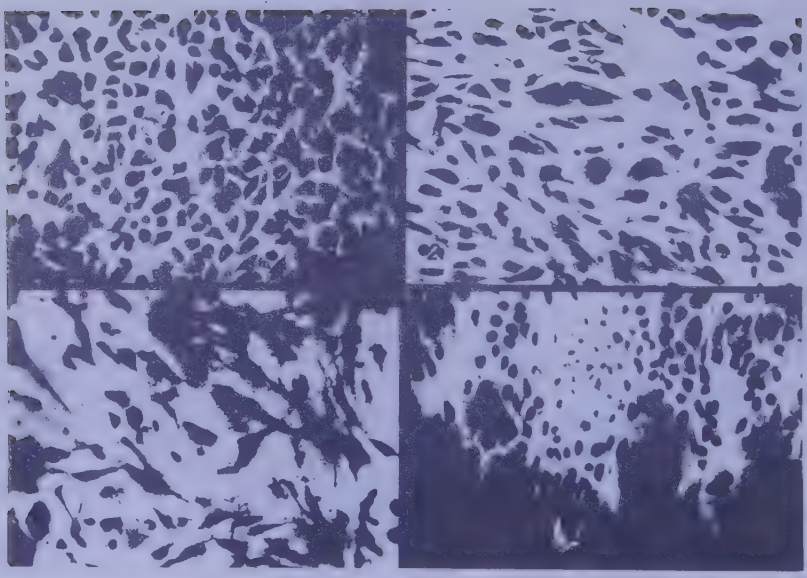


Abb. 7
Steroidwirkungen auf DMBA-Tumoren im In-Vivo-Test

1.)Kontrolle,
homogenes Zellbild

2.)Östrogen,
mäßiger cytostatischer Effekt, Stromaanteil des Tumors vermehrt

3.)Gestagen,
Proliferationshemmung der Tumorzellen

4.)Kortikosteroid,
Zellwachstum nahezu unverändert

Kulturen blieben unbeeinflußt oder zeigten proliferative Effekte. Nach Gestagenbehandlung traten in 48%, nach Kortikosteroidbehandlung in 36% der untersuchten Gewebe zytostatische Wirkungen auf. (Tab. 8).

Cytostatische Wirkung von Hormonen im In-Vivo-Test.

	Östrogene		Gestagen	Kortikosteroid	Hormonwirk. Zahl der
	oral	i.p.			
Endometrium: in Funktion	5/10	6/10	6/9	5/10	22/39
Atrophie	3/3	1/3	1/2	0/2	5/10
Corpus-Ca.	0/5	0/4	1/4	0/5	1/18
Ovarial-Ca.	2/6	3/6	1/3	1/4	7/19
DMBA-Tu.	3/5	4/6	3/7	4/7	14/25
Insgesamt	13/29 45%	14/31 45%	12/25 48%	10/28 36%	49/111 44%

Tab. 8
Zytostatische Wirkung der verschiedenen Steroidhormone auf die untersuchten Gewebe.
Zytostatische Wirkung / keine zytostatische Wirkung

Die Körpergewichte der Versuchstiere verringerten sich während des 6-tägigen Versuches um durchschnittlich 15 g bei den Kontrolltieren. Bei den mit Kortikosteroid, Gestagen behandelten Tieren und

ebenso nach oraler Gabe von Östrogenen gab es größere Gewichtsverluste, die in der Verteilungskurve bis zu 30 g betrugen, wobei die mit SH 582 behandelten Tiere die größten Einbußen hatten. (Tab. 9).

Gewichts-
veränderung

Gewichts-änderung	Presomen oral	Presomen i.p.	SH 582	Ultracorten-H	Kontrolle
+10	0	0	1	1	1
± 0	1	1	0	2	0
-10	5	10	4	7	11
-20	9	9	9	6	7
-30	3	4	7	3	3
-40	2	1	1	2	1
-50	1	0	0	1	0

Tab. 9
Gewichtsveränderung in Gramm bei Ratten unter Behandlung mit Steroidhormonen, während der Zeit von Implantation bis Entnahme der Kammer.

Diskussion:

Wenn heterologes Gewebe einem Versuchstier implantiert wird, sind Abwehrreaktionen von Seiten des Wirtes zu erwarten. Ein Eindringen von Wirtszellen durch die Poren der verwendeten Filter in das Diffusionskammerlumen ist, im Gegensatz zu den früher verwendeten Membranfiltern (61), niemals beobachtet worden. Dagegen finden sich regelmäßig auf der Außenseite der Filter, wohl chemotaktisch angelockt, Leukozyten und Mastzellen des Wirtstieres in einer dichten Zell[illegible]

Die den Operationspräparaten entnommenen Gewebe, welche auf ihr Wachstumsverhalten unter [illegible] einwirkung geprüft werden sollen, enthalten [illegible] Epithel- bzw. Malignomzellanteile als auch Bindegewebs[illegible] bestandteile. Unter dem hier verwendeten Trypsinierungsverfahren zur Gewinnung von Zellkulturen können völlig homogene Zellsuspensionen beider Zellanteile hergestellt werden. Die Beeinflussung der verschiedenen Zellarten in ihrer Proliferation untereinander, im Sinne einer Kontakthemmung, wie sie in Kulturen mit verschiedenen anderen Zellkombinationen bekannt sind (69), treffen für die Kombination Epithel- bzw. Malignomzellen-Fibroblasten nicht zu und werden weder in hormonbehandelten Kulturen noch in Kontrollkulturen beobachtet.

Die Auswertung der Teste dieser Untersuchung wird nur nach morphologischen Kriterien vorgenommen, da es eine überzeugende Differentialfärbemethode zur Unterscheidung von Epitheloidzellen und Fibroblasten nicht gibt (34). Für die Kulturen von Ovarialkarzinomen und Adenokarzinomen des corpus uteri bestehen dabei keine Schwierigkeiten. Die Variabilität der Fibroblasten innerhalb von Endometriumkulturen ist oft so ausgeprägt, daß die Unterscheidung gegenüber den Epithelzellen im Einzelfalle nicht immer gelingt (47, 48). Auf den mit Endometrium bewachsenen Filtern lassen sich jedoch immer Stellen zur Auswertung finden, die eine

typische Unterscheidung zulassen. Mit einiger Übung lassen sich auch die langspindeligen Fibroblasten von den zumeist polygonalzipfligen sarkomatösen Zellen der DMBA-Tumoren unterscheiden, sodaß die Ergebnisse der Auswertung an hormonbehandelten und unbehandelten Tumorgeweben, vom Geübten gestellt, auch reproduzierbar sind. Für die Wirksamkeit von Steroidhormonen, jeweils auf das Wachstum von Epithelzellen und Fibroblasten, besteht ein pharmakologisches Interesse.

Die Vorgänge, die sich abspielen, sobald Steroidhormone auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Zellen des Erfolgsorganes einwirken, beginnen an der Zelloberfläche. Obgleich über das Eindringen der Steroidmoleküle in die parallel geordneten Phospholipide der Zellmembran nur Vermutungen bestehen, erklären Modellversuche die heutigen Vorstellungen vom Wesen der Steroidwirkung an der Zelloberfläche (44). Durch die Einführung von Steroidmolekülen in die Membran einer Zelle gelangen neue biochemisch aktive Endgruppen in eine definierte Anordnung zu den Phospholipidmolekülen. Dadurch können veränderte Oberflächeneigenschaften erworben werden. Diese Änderungen betreffen Faktoren wie Hydrophilie, Lipophilie, chemische Affinität zu benachbarten Molekülen, Richtung der Penetration usw. Auch das Oxydationsreduktionspotential wird beeinflußt. Durch die Einführung neuer aktiver Endgruppen wird ebenso die chemische Affinität zu Eiweißmolekülen verändert, sodaß neue spezifische Funktionen enzymatischer Art entstehen. Verantwortlich für die Aktivität an der Zellmembran sind bei den Östrogenen die endständigen phenolischen Hydroxylgruppen. Die Progesteronwirkung ist an die endständige Ketogruppe gebunden, die Wirkung der Kortikosteroide an die alpha-Ketolgruppierung. Die gleichen Mechanismen spielen sich an den Membranen der Zellorganellen ab (44).

Auf welche Weise die Steroidmoleküle zum Zellkern gelangen oder ob für alle Steroide ihre

Anwesenheit am Zellkern zur Beeinflussung der Zellteilung und des Zellwachstums überhaupt nötig ist, blieb bisher ungeklärt. Ein Eingreifen der Hormone in den Nukleinsäurestoffwechsel der Zelle, sei es als Coenzym (31), durch Veränderung von Enzymaktivitäten anderer Art im Zytoplasma (51), oder durch Anlagerung an Basen der Nukleinsäuren mit Bildung veränderter Proteine (64), ergaben sich aus Einzelun-
suchungen. Eine einheitliche Wirkungsweise der
auf die Zelle des Erfolgsorganes scheint nich
bestehen (43), obwohl letztlich als metabol
Parameter für die Steroidwirkungen allenfalls
änderungen der DNS-Synthese bestehen (3, 56).
Tatsache findet ihren Niederschlag auch in Veränderungen der Mitoserate und der Zahl von sexchromatinhaltigen Kernen unter Anwendung von Steroiden und in hormonabhängigen Tumoren (19, 14, 57). Neben der direkten Wirkung auf die Zellen hormonabhängiger Tumoren spielen für die zytostatischen oder wachstumsfördernden Einflüsse die Interferenz verschiedener Steroide und ihrer Abbauprodukte eine Rolle (30). Eine Prognose über die Wirkung an Tumorgeweben ist im Einzelfall auch deshalb nicht zu stellen, weil die Konzentration der Steroide in der Zelle und in der Nährlösung der Zellen die Anordnung der Endgruppen in den Phospholipidmembranen sowohl an verschiedenen Stellen als auch in zeitlicher Abhängigkeit sich verändern kann.

Durch die Anwendung der Diffusionskammertechnik zur Untersuchung der Hormonwirkungen auf menschliche Gewebe werden die Steroide unter den Bedingungen des metabolischen Auf- und Abbaus durch den Wirtsorganismus untersucht. Sowohl inkretorische Regulationsmechanismen (66) als auch biochemische Umwandlung der Hormone durch die entsprechenden Organe des Versuchstieres sind mit in die Versuchsanordnung einbezogen. Die Stoffwechselleistung der Ratte im Bezug auf die applizierten Steroide ist zumindest adäquat der bei Menschen.

Welche Faktoren und Organe (auch maligne Tumoren) den Hormonmetabolismus beeinflussen bis und während die entsprechenden Hormonkonzentrationen am Wirkungsort angreifen können, läßt sich zum Teil durch viele neuere Untersuchungen nachweisen (5, 8, 20, 22, 45, 49, 50, 59).

Die Beobachtungen am atrophischen Endometrium bestätigen die klinische Erfahrung, daß konjugierte Östrogene auch bei längerer Anwendung in sinnvoller Dosierung zur Therapie klimakterischer Beschwerden geeignet sind und menschliches Endometrium nicht zur Proliferation anregen (7, 36, 37, 58, 68). Dagegen zeigen die Ergebnisse im in-vivo-Test nach Östrogengabe an funktionsfähigem Endometrium einen gesteigerten Effekt auf das Wachstum der Drüsenepithelzellen, besonders ausgeprägt nach wiederholter oraler Applikation.

Die Medikation konjugierter Östrogene erfolgt in der Klinik und Praxis zur Behandlung von Beschwerden, die abgesehen von Involutionsvorgängen im weiblichen Genitalbereich über das gynäkologische Fachgebiet hinausreichen und vordergründig betrachtet, auf Grund der somatisch-trophischen, vegetativen und psychischen Symptome das Fachgebiet der Inneren Medizin und der Psychiatrie tangieren. Der Umfang dieser Hormonbehandlung richtet sich nun auch folgerichtig nach der Beseitigung der jeweils von den Patientinnen angegebenen Symptomatik. Allerdings zwingt gelegentlich das Auftreten von Durchbruchsblutungen unter der Hormonbehandlung, insbesondere bei Patientinnen im frühen Klimakterium zur Umstellung oder Abbruch dieser Therapie Diese Tatsache findet eine Erklärung in den hier ermittelten experimentellen Ergebnissen: Ein nicht voll atrophisches Endometrium wird auch durch die tägliche Einnahme von konjugierten Östrogenen zur Proliferation stimuliert. Je nach der individuellen Regulations-

fähigkeit des Patienten sind Durchbruchsblutungen möglich. Besteht jedoch ein bereits nachgewiesen atrophisches Endometrium, so können zur Therapie klimakterischer Ausfallserscheinungen täglich Östrogenmengen von 1,25 mg gegeben werden, ohne daß eine Blutung befürchtet werden muß.

Eine unter der Behandlung mit konjugierten Östrogenen auftretende Blutung zwingt den behandelnden Arzt zu differentialdiagnostischen Überlegungen. Bei der Patientin ruft die Tatsache einer wiedereintretenden Blutung oft unangenehme Sensationen [illegible]. Es ist also zu fordern, daß eine Substitutionsthe[illegible] mit konjugierten Östrogenen möglichst gering [illegible] werden sollte, so lange der behandelnde Arzt die Funktionsfähigkeit des Endometriums seiner Pati[illegible] nicht kennt.

Gestagene Substanzen bewirken am Endometrium ein vermindertes Wachstum der Drüsenepithelien. Vergleichbare Parameter einer funktionellen Stimulierung dieses Hormones lassen sich im gezüchteten Gewebe nicht finden. Die bindegewebigen Zellanteile erfahren eine Wachstumssteigerung (32).

Mit der Absicht, an Tumoren des weiblichen Genitale unter Behandlung mit Steroidhormonen cytostatische Effekte zu erzielen, kann man auf resistentes Tumorgewebe stoßen, das dann neben indifferentem Verhalten gegenüber Hormonen auch eine echte Proliferationssteigerung der Tumorzellen aufweist.

In diesen Untersuchungen konnte erstmalig der Beweis erbracht werden, daß menschliche Karzinome des Corpus uteri und Ovars unter Anwendung von Östrogenen im therapeutischen Bereich der üblichen Dosierung zu einer Proliferationssteigerung der malignen Tumoranteile stimuliert werden (6, 54). Die Einschränkung zur Indikation von Östrogenen im klinischen Bereich sind also durchaus berechtigt (7, 11, 38). Die Wirkung der Östrogene auf die Einzelzelle der Tumoren ist zu

vergleichen mit den Ergebnissen elektronenoptischer Studien über die Östrogenwirkung auf Epithelzellen juveniler Rattenweibchen (3). - Auch Kortikosteroide führen im in-vivo-Test zu einer starken Vermehrung der Tumorzellen des Korpuskarzinomes bei gleichzeitiger Abnahme bindegewebiger Anteile.

Die Eigenschaft organotroper Hormone auch Proliferationen auszulösen muß bei Vorliegen einer genetischen Belastung - die im Einzelfall nicht zu erfassen ist - zu den "bedingt krebsauslösenden Noxen" im Sinne Butenandts gerechnet werden (9). Die Folgerung daraus besteht in der berechtigten Forderung nach dem regelmäßigen Einsatz der Krebsfährtensuche und Frühdiagnostik (41).

Unter Gestageneinfluß erhält das Adenocarcinoma corporis uteri eine Zunahme des Fibroblastenwachstums, während unter den Tumorzellen drei Tage nach der Hormonbehandlung keine Veränderungen auftreten. Diese Reaktion entspricht der histologischen Beobachtung, wobei nach längerer Therapie mit 17 alpha-Hydroxyprogesteron-capronat die Malignomzellen durch fibröses Stroma ersetzt werden (54, 67). Dabei scheinen die Östrogenspiegel für die Gestagenwirkung am Endometrium-Karzinom sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eine entscheidende Rolle zu spielen (46, 54, 70).

Die unterschiedliche Wirkung, die nach Kortikosteroidanwendung in den in-vivo-Testen auf das Fibroblastenwachstum der jeweiligen Gewebe resultiert, wird bestimmt durch die Anwesenheit von Epithel- bzw. Malignomzellen, den Reifegrad der "target-cells", von der Struktur des verwendeten Kortikosteroids und seiner Biotransformation in der Zelle, außerdem vom RES des Wirtstieres (15, 53). In dieser Beziehung weichen die Testergebnisse bei den verschiedenen untersuchten Geweben von der klinischen Vorstellung von der Wirkung der Kortikoide auf das jugendliche Bindegewebe zum

Teil erheblich ab. Die cytostatischen Wirkungen nach Gestagenbehandlung (48%) und Kortikosteroidbehandlung (36%) stehen in einem vergleichbaren Verhältnis zu den Testergebnissen in vitro, wobei im gleichen Dosisbereich nach Gestagengabe in 35%, nach Kortikosteroidbehandlung in 23% der Fälle cytostatische Effekte resultierten (27).

Die durch Dimethylbenzanthrazen induzierten Rattentumoren erfahren eine Wachstumssteigerung, wenn in der Präinduktions- und Induktionsphase Kortikosteroide appliziert werden (21, 29, 52). Wahrscheinlich ist diese Tatsache auf eine Hemmung der Antikörperbildung zurückzuführen (52). Eine cytostatische Wirkung auf Subkulturen dieser Tumoren im in-vivo-Test konnte im Gegensatz zum Therapieerfolg an Primärtumoren nicht nachgewiesen werden (21). Dagegen wurden ausgeprägte cytostatische Effekte nach Östrogen- und auch Gestagengabe verzeichnet.

Die bei den Untersuchungen der cytostatischen Wirkung verschiedenen Steroidhormone im Diffusionskammerverfahren ermittelten Ergebnisse sprechen für die Berechtigung der Palliativbehandlung maligner Tumoren mit Hormonen. Die bisherigen klinischen Erfolge sind nicht einheitlich (12, 18, 23, 33, 35, 66). Dabei ist auffällig, daß man gelegentlich verschiedene Steroide kombiniert einsetzt. Der Zweck dieser Maßnahmen basiert auf den empirischen Beobachtungen der besseren Wirksamkeit und der oft unbewußten Überwindung der Resistenz der behandelten Tumoren gegenüber einem Hormon. Das Resistenzphänomen als Eigenschaftsänderung der Tumorzelle (40, 55) unter der Behandlung mit Steroiden, konnte auch am benignen und malignen Gewebe in in-vitro-Versuchen beobachtet werden. Die mittels Diffusionskammertechnik durchgeführten in-vivo-Untersuchungen bestätigten diese Erscheinung in vergleichbarem Umfang. Die im Tierversuch durchgeführte Testung verschiedener

Steroidhormone hinsichtlich ihrer cytostatischen Wirksamkeit auf maligne Gewebe ist eine wertvolle Unterstützung für die klinischen Bemühungen um eine gezielte Hormontherapie. Es wird damit ein Weg aufgezeigt um Hormone in der Therapie endokrin stimulierter Erkrankungen und Tumoren sinnvoll einzusetzen. Testreihen über die Wirkung von Steroidhormonen in verschiedenen Kombinationen können die Möglichkeiten einer Sensibilitätstestung der entsprechenden Gewebe noch erweitern. Dies ist besonders wichtig für die Palliativbehandlung maligner Tumoren, da Anzeichen dafür bestehen, daß cytostatische Wirkungen dem Synergismus zweier verschiedener Hormone bedürfen (12, 54).

Zusammenfassung:

Mit der neuen Diffusionskammertechnik des in-vivo-Testes wurde die Wirkung von konjugierten Östrogenen, Gestagen und Kortikosteroiden auf Endometrium, Corpus- und Ovarialkarzinomen des Menschen und auf DMBA-Tumoren der Ratte untersucht. Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse gefunden:

1.) Konjugierte Östrogene steigern am Endometrium in Funktion die Proliferation der Drüsenepithelien und des bindegewebigen Stromas bei einer Einzeldosis unabhängig von der angewandten oralen und parenteralen Applikation.

2.) Nach Fraktionierung der Einzeldosis über 5 Tage ist eine Vermehrung des Zellwachstums auf 228% nach oraler und 161% nach parenteraler Anwendung zu beobachten. Die Proliferation der Drüsenepithelien beträgt hierbei 219% des Ausgangswertes nach oraler und 150% nach parenteraler Applikation.

3.) Eine Proliferationssteigerung war am atrophischen Endometrium durch konjugierte Östrogene nicht zu beobachten.

4.) Gestagen hemmt die Proliferation der Epithelzellen am funktionierenden Endometrium. Bei Atrophie der Schleimhaut ist die Wirkung des Gestagen indifferent.

5.) Kortikosteroid wirkt cytostatisch bei Endometrium in Funktion; im Zustand der Funktionsruhe ist hingegen eine Zunahme des Zellwachstums auf 158% der Kontrollen nachweisbar.

6.) Konjugierte Östrogene steigern beim Corpus- und Ovarialkarzinom die Proliferation unabhängig von der oralen oder parenteralen Applikation. Beim Adenocarcinoma corporis uteri ist die Proliferation der Karzinomzellen gegenüber den Fibroblasten vermehrt. Das Ovarialkarzinom reagiert mit einer Zunahme des Fibroblastenanteiles auf 131% der Kontrollen, die Drüsenepithelzellen hingegen bleiben weitgehend unbeeinflußt.

7.) Östrogene bewirken einen cytostatischen Effekt an dem DMBA-Tumor, der zu einer Abnahme der Malignomzellen auf 87 - 75 % der unbehandelten Kontrollen führt.

8.) Die cytostatische Wirkung des Gestagen am Corpuskarzinom wird durch Ersatz der epithelialen, malignen Anteile des Tumors durch das stark proliferierende fibröse Stroma eingeleitet. Diese Frühwirkung ist im in-vivo-Test bereits drei Tage nach Einwirkung des Gestagen nachweisbar.

9.) In gleicher Weise reagiert das Ovarialkarzinom mit einer vermehrten Proliferation des Bindegewebes auf die Behandlung mit Gestagen. Die Karzinomzellen sind zahlenmäßig unverändert, sie weisen wie die Corpuskarzinomzellen einen vergrößerten Kerndurchmesser und eine Abnahme der Zellgröße auf.

10.) Der DMBA-Tumor verhält sich gegenüber einer Gestagenbehandlung indifferent.

11.) Kortikosteroidbehandlung eines Corpuskarzinoms führt zu vermehrtem Tumorwachstum. Die Proliferation der Karzinomzellen steigt auf 147% der Kontrollen bei reduziertem Fibroblastenwachstum. Die Karzinomzellen weisen eine Größenzunahme des Kernes und eine Abnahme der Einzelzelle auf. (Verschiebung Kern-Plasma-Relation).

12.) Ovarialkarzinom und DMBA-Tumor erwiesen sich gegenüber einer Behandlung mit Kortikosteroid indifferent.

L I T E R A T U R N A C H W E I S

1.) Albert, Günther: Zur Frage der Übertragbarkeit der natürlichen Tumorresistenz durch Parabiose.
Zeitschrift für Krebsforschung 68
150 - 155 (1966)

2.) Algire, G.H., Weaver, J.M., Prehn, R.T.:
Growth of Cells in Vivo Diffusi Chambers.
I. Survival of Homografts in Immunized Mice.
J.nat.Cancer.Inst. 15 493 (1954)

3.) Bässler R., Forssmann W.:
Experimenteller Strukturwandel der Drüsenzelle durch Hormonwirkung.
Verhl. der Dtsch. Gesellschaft für Pathologie, 48. Tagung, Salzburg vom 31. März - 4. April 1964
Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart 1964

4.) Berliner D.L.: Studies of the Mechanism by which Cells Become Resistent to Corticosteroids.
Cancer Research 25 1085-1095 (1965)

5.) Berliner D.L., Dougherty T.F.:
Influence of Reticuloendothelial and other Cells on the Metabolic Fate of Steroids.
Ann.New York Acad.Sc. 88 14-29 (1960)

6.) Bornebusch H.: Können Östrogene ein Karzinom herbeiführen?
Med. Klinik 61 285-287 (1966)

7.) Brazel E.: Konjugierte Östrogene im Klimakterium und bei dyshormonalen Zuständen.
Die Med. Welt 17 1408-1410 (1966)

8.) Brown J.B., Beischer N.A., Smith A.M.:
Excretion of Urinary Estrogens in Pregnant Patient Treated with Cortisone and its Analogues.
J. Obstet. Gynaec.Brit. Cwlth. 75 819-828 (1968)

9.) Butenandt A.: Zur physiologischen Bedeutung des Follikelhormones und der östrogenen Wirkstoffe für die Genese des Brustkrebses und die Therapie des Prostata-Karzinomes.
Dtsch.med.Wschr. 75 1409-1410 (1950)

10.) Champbel, J.B., Basset C.A.L., Husby J., Thuhu C.A., Feringa E.R.:
Microfilter Sheats in Peripherial Nerve Surgery.
J. Trauma 1 139-155 (1961)

11.) Charles, D. u.a.:
Endometrial Carcinoma-Endocrinological and Clinical Studies.
Americ.J.Obstet.Gynec. 91 1050-1059 (1965)

12.) Crowley L.G., Macdonald I., Lawrence G.:
Delalutin and Estrogens for the Treatment of Advanced Mammary Carcinoma in the Postmenopausal Woman.
Cancer 18 436-446 (1965)

13.) Curran R.C., Agar. J.A.M.:
Tissue responses to filter membranes of various porosities.
Nature 189 1023-1024 (1961)

14.) Dokumov Stojan J., Spasov A.S.:
Kern-Sexchromatinkörper und östrogene Aktivität.
Zeitschr.f.Geb. und Gyn. 169 85-91 (1968)

15.) Dougherty T.F., Berliner D.L., Berliner M.L.:
Corticosteroid-Tissue Interactions.
Metabolism 10 966-988 (1961)

16.) Dulbecco u. Vogt:
Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wasch.) 38 749 (1952)

17.) Earle, Wilton, R.u.a.:
Influence of Class and Cellophane Substrates of the Proliferation of Strain L cells in Tissue Culture.
Journal of the National Cancer Institute.
Vol 12 1 (1951)

18.) Emerson W.J., Kennedy B.J., Graham J.N., Nathanson J.T.:
Pathology of Primary and Recurrant Carcinoma of the Human Breast after Administration of Steroid Hormones.
Cancer 6 641-670 (1953)

19.) Fischer P., Golob E., Holzner J.H.:
Zytogenetische Beobachtungen am Ovarialkrebs.
Krebsarzt 23 1-9 (1968)

20.) Gallagher T.F., Bradlow H.L., Miller D.G., Zumoff B., Hellman L.:
Steroid Hormone Metabolism in Chronic Lymphatic Leukaemia.
The J. of Clin. Endocrin. and Metabol.
22 1049-1056 (1962)

21.) Chadially F.N., Green H.N.:
The Effect of Cortisone on the Chemical Carcinogenesis in the Mouse Skin.
The Britisch J. of Cancer 8 291-295 (1954)

22.) Cordin A.S., Mirand E.A., Zanjani E.D.:
Mechanisms of Prednisolone Action in Erythropoesis.
Endocrinology 81 363-368 (1967)

23. Halter G.: Die Hormonbehandlung des Mammakarzinoms und des weiblichen Genitalkarzinoms. Wiener Klin. Wochenschr. 78 473-475 (1966)

24.) Heckmann, U.: Zur Wirkung des Norhydroxyprogesteron-capronat auf das Adenocarcinoma uteri in der Gewebekultur. Dt.Med.Wschr. 90 2328-2330 (1965)

25.) Heckmann, U.: Zur Resistenzprüfung menschlicher Krebsgewebe gegen Cytostatica in vitro und in vivo. VthInt.Congress of Chemotherapie Verlag der Wiener Med. Akademie 197 - 204 (1967)

26. Heckmann, U.: Zur Prednisolonwirkung auf Malignomzellen in der Gewebekultur. Die Med. Welt 18 483-485 (1967)

27.) Heckmann, U.: Cytostatic Action of Hormones on Human Cancer in Tissue Culture. 2ndInt.Symp.Brd. Characterisation Human Tumors, Rom, 26. April 1967

28.) Heckmann, U.: Neue Möglichkeiten einer Resistenzprüfung menschlicher Karzinomgewebe gegen Cytostatica im in-vivo-Test. Dtsch.Med. Wochenschrift 92 932-935 (1967)

29.) Heilman F.R., Kendall E.C.: The Influence of 11-Dehydro-17-Hydroxy Corticosteron (Compound E) on the Growth of Malignant Tumor in the Mouse. Endocrinology 34, 35 416-420 (1944)

30.) Huggins Ch.: Two Principles in Endocrine Therapy of Cancer: Hormone Deprival and Hormone Interference.
Cancer Research 25 1163-1167 (1965)

31.) Hurlock B., Talalay P.:
3-Alpha-Hydroxysteroids as Coenzymes of Hydrogen Transfer between Di- and Triphosphorpiridine Nucleotides.
J. biol. Chem. 233 886-893 (1958)

32.) Kaiser R.: Der cytostatische Effekt verschiedener gestagener Substanzen.
Sechstes Symposium d. Dt. Ge. für Endokrinologie 28.4. - 30.4.59 S. 64-68

33.) Kennedy B.J., Brown J.H.:
Combined Estrogenic and Androgenic Hormone Therapy in Advanced Breast Cancer.
Cancer 18 431-435 (1965)

34.) A. Kratochwil, E. Honus, H. Holzner:
Kultivation des menschl. Cervixcarcinoms in vitro.
Archiv für Gynäkologie 200 321-326 (1965)April

35.) Landau R.L., Ehrlich E.N., Huggins Ch.:
Estradiol Benzoate and Progesterone in Advanced Human-Breast-Cancer.
The J. of the Amer.Med.Ass 182 632-636 (1962)

36.) Lauritzen, C.: Kritische Bemerkungen zur Behandlung klimakterischer Beschwerden mit Östrogen-Androgen-Kombination.
Ärztl.Mitteil.Dt.Ärztebl. 60 2549-2561 (1963)

37.) Lauritzen, C.: Behandlung klimakterischer Beschwerden mit konjugierten Östrogenen.
Med. Klin. 59 666-667 (1964)

38.) Lauritzen, C.: Östrogenbehandlung im Klimakterium.
Die Med. Welt 51 2893-2894 (1965)

39.) Lettré, Hans: Hemmungen der Zellteilung durch östrogene Faktoren.
Die Chemie 55 265 (1942)

40.) Lettré, Hans: Eigenschaftsänderungen von Tumorzellen.
Zeitschr. für Krebsforsch. 59 568 (1953-54)

41.) Limburg, H.: Die Frühdiagnose des Uteruskarzinoms.
G.Thieme Verlag Stuttgart 1956

42.) Limburg, H., Krahe:
Die Züchtung von menschl. Krebsgewebe und seine Sensibilitätstestung gegen neuere Cytostatica.
Dtsch. Med. Wschr. 89 1938 (1964)

43.) Melmykovych G., Bishop C.F.:
Specificity of Prednisolone Effect on Cell Volume, RNA and Protein in Cell Lines Inducib and Noninducible Alkaline Phosphatase.
Endocrinology 81 251-255 (1967)

44.) Millmer N.E.: Steroids and Cells Surfaces.
Biol. Rev. 36 368-398 (1961).

45.) Monder, Carl: Stability of Corticosteroids in Aqueous Solutions.
Endocrinology 82 104-107 (1968)

46.) Nordquist R.: Hormone Effects on Carcinoma of the Human Uterine Body Studied in Organ Culture.
Acta Obstet.Gynec. Scand. 43 296-307 (1964)

47.) Papanicolaou G.N., Maddi F.V.:
Observations of the Behavior of Human Endomet Cells in Tissue Culture.
Amer. J. Obstet.Gynec. 76 601-618 (1958)

48.) Papanicolaou G.N., Maddi F.V.:
Further Observations on the Behavior of Human Endometrial Cells in Tissue Culture.
Amer.J.Obstet.Gyn. 78 156-173 (1959)

49.) Perlmann, D., Giuffre N.A., Brindle A., Pan S.C.:
Cytotoxicity of Steroids to Mammilian Cells in Tissue Culture.
Proc.Soc.of Experim.Biol. 111 623-625 (1962)

50.) Plotz E.J.: Metabolism. of Estrogens.
Acta Cytologica 2 332-337 (1958)

51.) Rosen, F.: Enzymes in Tissues Responsive to Corticosteroids.
Cancer Research 23 1447-1456 (1963)

52.) Rosenkilde, H.: Küchenmeister H., Herzberg J.J., Lange-Cordes E.:
Der Einfluß von Cortison auf das Wachstum chemisch erzeugter Hauttumoren.
Klin. Wochenschrift 582-585 (1955)

53.) Ruhmann, A.G., Berliner D.L.:
Effect of Steroids on Growth of Mouse Fibroblasts in Vitro.
Endocrinology 76 916-927 (1965)

54.) Schermann, A.J.:Cancer of the Female Productive Organs.
The C.V. Mosley Co., St. Louis 1963

55.) Schindler R.: Mechanismus der Resistenz gegen antineoplastische Arzneimittel.
Schweiz.Med.Wschr. 95 1763-1766 (1965)

56.) Seifert R. und Hilz H.:
Selective and Reversible Inhibition of Proliferation and Influence on Metabolic Functions in L Cells by low Cortisol Cocentrations.
Acta endocrin 53 189-204 (1966)

57.) Siebner H.: Zur Bedeutung der Barrschen Zellkerne beim Brustkrebs der Frau.
Med. Klin. 60 1078-1079 (1965)

58.) Siegel P., Heinen G.:
Die Reaktion des Endometriums auf die zyklische Behandlung mit Ovulationshemmern.
Geburtsh. und Frauenheil. 25 312-319 (1965)

59.) Sweat M.L., Grossner B.J., Berliner D.L., Swim H.E., Nabors N.J., Dougherty T.F.:
The Metabolism of Cortisol and Progesterone by Cultured Uterine Fibroblasts, Strain U 12-705.
Biochem. et Biophys.Acta 28 591-595 (1958)

60.) Teichmann B., Wittig G.:
Über die Verwendung von Metallkammern für Implantationsgewebe.
Acta biol.med.Germ. 10 429-431 (1963)

61.) Teichmann B., Wittig G.:
Über die Verwendung von Membranfiltern für Gewebezüchtung in vivo.
Z.Naturforsch. 18b 526-529 (1963)

62.) Teichmann B., Wittig G.:
Tumor Cells in Chambers Implanted into Immunized Rats.
Nature 200 373 (1963)

63.) Teichmann B., Wittig G. und Vogt R.:
Das Verhalten von Ratten gegenüber Zweittransplantaten nach Implantation von Tumorgewebe in Diffusionskammern.

64.) Tomita M., Kineshiro N., Katsuhito T., Akinubu S.:
Antikrebswirkungen verschiedener Hydroxysäuren auf Ehrlich Ascites-Carcinoma.
Physiol. Chemie 342 4-6 (1965)

65.) Ufer, J.: Hormontherapie in der Frauenheilkunde. Verlag Walter de Gryter & Co. Berlin 1959

66.) Varga A., Henriksen E.: Clinical and Histopathologic Evaluation of the Effect of 17 Alpha-Hydroxy-Progesterone - 17n - Capronat of Endometrial Carcinoma. Obstet. and Gynec. 18 658-671 (1961)

67.) Varga A., Henriksen E.: Histologic Observations on the Effect of 17 Alpha-Hydroxyprogesterone - 17n - Capronat on Endometrial Carcinoma. Obst.Gynec. 26 656-664 (1965)

68.) Warnecke, G.: Konjugierte Östrogene im Klimakterium. Die Med. Welt 17 1410-1413 (1966)

69.) Wilbank, George D., and Richart Ralph M.: The in Vitro Interaction of Intraepithelial Neoplasma, Normal Epithelium and Fibroblasts from the Adult Human Uteri Cervis. Cancer Research 26 1 (1966)

70.) Wilson R.A.: The Roles of Estrogen and Progesterone in Breast and Genital Cancer. The J. of the Amer.Med.Ass. 182 327-331 (1962)

Danksagung:

Zu aufrichtigem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. H. Limburg verpflichtet, in dessen Klinik mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht wurde. Herrn Priv. Doz. Dr. U. Heckmann sei gedankt für die Formulierung des Themas der Arbeit, die vielen Hinweise und Ratschläge zur Überwindung experimenteller Schwierigkeiten und die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse. Ebenso gilt mein Dank dem Personal im Gewebezuchtlabor und im Tierstall der Universitäts-Frauenklinik, das mir bei der Aufbereitung der untersuchten Gewebe und bei den Tierversuchen eine wertvolle Hilfe war.

L E B E N S L A U F

Am 7.3.41 wurde ich als Sohn des Dr. jur. Werner Rothe und dessen Ehefrau Käte in Aschaffenburg geboren. Im Herbst 1947 war meine Einschulung in der Volksschule in Reinheim im Odenwald. Ab Ostern 1952 besuchte ich das damalige Realgymnasium in Gross-Bieberau, mußte dann die drei letzten Jahre bis zum Abitur das Gymnasium in Gross-Umstadt besuchen, da erstere Schule keine Vollanstalt war.

Im März 1961 legte ich die Reifeprüfung ab. Darauf folgte ein halbes Jahr Praktikum und ein Semester Studium Brauereitechnik an der TH - München. Im Sommersemester 1962 begann ich das Medizinstudium an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/M. Hier legte ich im Oktober 1963 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im September 1965 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach einem weiteren Semester in Frankfurt setzte ich das Studium an der Universität des Saarlandes an den Universitäts-Kliniken Homburg/Saar fort. Hier begannen auch meine Vorbereitungen zur Doktorarbeit in der Universitäts-Frauenklinik. Im Dezember 1968 legte ich die ärztliche Prüfung ab. Die beiden anschließenden Monate waren mit der Weiterführung der Doktorarbeit ausgefüllt.

Am 1. März 1969 trat ich meine erste Medizinalassistentenstelle an der Inneren Abteilung des Fürst-Carl-Landeskrankenhauses in Sigmaringen an.